






METHOD FOR INHIBITION OF VIRAL MORPHOGENESIS

Patent number: WO9324660
Publication date: 1993-12-09
Inventor: GLENN JEFFREY (US)
Applicant: UNIV CALIFORNIA (US); GLENN JEFFREY S (US)
Classification:
- **international:** C12Q1/70; C12N7/04; C12N7/06; A61K35/76
- **european:** A61K31/365; A61K38/00A; C07K14/08; C12N7/06;
C12Q1/18; C12Q1/68P; G01N33/50D2; G01N33/569K;
G01N33/576D
Application number: WO1993US05247 19930601
Priority number(s): US19920890754 19920529

Also published as:

 EP0672192 (A1)
 US5503973 (A1)
 JP2005124577 (A)
 EP0672192 (A4)
 EP0672192 (B1)

[Report a data error here](#)

Abstract of WO9324660

Viral morphogenesis, production, release or uncoating can be inhibited by effecting inhibition of prenylation of, or inhibition of post-prenylation reactions of, at least one viral protein. The use of inhibitors of prenylation, and post-prenylation reactions, for example, inhibitors of the mevalonate and prenyl group synthesis pathways, inhibitors of prenyl group transferases and mimics of the prenylation target CXXX (SEQ ID NO:1) box are disclosed.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

BEST AVAILABLE COPY

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平8-502162

(43) 公表日 平成8年(1996)3月12日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I
C 1 2 N 7/04		8931-4B	
A 6 1 K 45/00	ADY	8415-4C	
C 0 7 K 14/005		8318-4H	
C 1 2 N 7/06		8931-4B	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 24 頁)

(21) 出願番号	特願平6-500860
(86) (22) 出願日	平成5年(1993)6月1日
(85) 翻訳文提出日	平成6年(1994)11月29日
(86) 国際出願番号	PCT/US93/05247
(87) 国際公開番号	WO93/24660
(87) 国際公開日	平成5年(1993)12月9日
(31) 優先権主張番号	07/890, 754
(32) 優先日	1992年5月29日
(33) 優先権主張国	米国 (US)

(71) 出願人	グレン、ジェフリー エス. アメリカ合衆国、カリフォルニア 94304、 パロ アルト、ウェルチ ロード1130、 #336
(72) 発明者	グレン、ジェフリー アメリカ合衆国、カリフォルニア 94122、 サンフランシスコ、バーナサス アヴェニ ュー 750、#3
(74) 代理人	弁理士 加藤 朝道

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ウイルス形態形成抑止法

(57) 【要約】

少なくとも1つのウイルス蛋白のプレニル化或はポストプレニル化反応の阻害を図ることにより、ウイルスの形態形成、生成、放出或は脱外被を抑止することが出来る。プレニル化及びポストプレニル化反応の阻害剤、例えば、メパロネートやプレニル化化合物 (prenyl group) の合成経路の阻害剤、プレニル転移酵素の阻害剤やプレニル化標的CXXXボックスの擬態などを使用することが開示されている。

【特許請求の範囲】

1. ヴィリオン形態形成、生成、放出又は脱外被を抑止する方法であって、ウイルスに感染した細胞を、少なくとも1つのウイルス蛋白のプレニル化又はポストプレニル化反応を阻害する薬剤の効果量と接触させることから成る方法。
2. 該薬剤がプレニル化合物 (prenyl group) 合成の阻害剤であるか又はプレニル転移酵素の阻害剤であるか、或は該薬剤がプレニル化合物に擬体する (mimic) か又はウイルス蛋白のプレニル化配列 (locus) に擬体する、請求項1に記載の方法。
3. 該ウイルス蛋白が、式CXXX、XCXX、XXCX又はXXXCのC-末端アミノ酸配列を含み、上記において、Cはシステインであり、各Xはそれぞれ任意のアミノ酸である、請求項1に記載の方法。
4. 該薬剤が、CXXX、XCXX、XXCX又はXXXCに擬体する、請求項2に記載の方法。
5. 該薬剤が、ポストプレニル化反応を阻害するものである、請求項1に記載の方法。
6. 該ヴィリオンが、D型肝炎ウイルス (HDV) であり、該ウイルス蛋白が上記HDVの大デルタ抗原である、請求項1に記載の方法。
7. 上記阻害が、プレニル化に抵抗するように変異された複製物のトランス優性阻害剤によって行われる、

請求項6に記載の方法。

8. 該ヴィリオンが、ヒト免疫不全ウイルスであり、該ウイルス蛋白がネフ (nef) 蛋白である、請求項1に記載の方法。
9. 該細胞が動物又は植物被検体に含まれており、該接触が薬剤を上記被検体に投与することから成る、請求項1に記載の方法。
10. 候補薬剤をプレニル化阻害剤として選別する方法であって、

該方法は、“CXXX” ボックスを含む第1の蛋白と第2のコントロール蛋白を分泌する細胞か、或は分泌するように（上記において、第1の蛋白の分泌はプレニル化に依存し、第2のコントロール蛋白の分泌はプレニル化に依存しない）変異された細胞を、第2のコントロール蛋白が分泌される条件下で候補薬剤と接触さ

せること、及び

細胞から分泌される第 1 の蛋白の有無又は量を測定することを含み、

分泌された第 1 の蛋白の量を減少させるか或は無くする候補薬剤が効力のある
上記プレニル化阻害剤である、候補薬剤を選別する方法。

1 1. 上記第 1 の蛋白が、大デルタ抗原である、請求項 1 0 に記載の方法。

1 2. 上記第 1 の蛋白が、その“ CXXX” ボックスの代

わりに、異なった蛋白の“ CXXX” ボックスを含むように変異されたネイティブに
分泌された蛋白から成るキメラである、請求項 1 0 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】**【発明の名称】** ウイルス形態形成抑止法

この発明は、米国立衛生研究所の援助によりなされた。米国政府は、この発明になんらかの権利を有する。

【産業上の利用分野】

本発明は、ウイルス形態形成とウイルス感染の抑止に関する。特に、本発明は、ウイルス蛋白のプレニル化或はポストプレニル化反応を抑止することより、そのような抑止を行うことに関する。

【従来の技術】

ある種の膜結合性蛋白は、適切に機能するためには親油性残基の付与を必要とすることが示されてきている。疎水性残基はイソプレノイド前駆体から誘導されるので、そのような変異の一群は“プレニル化”と呼ばれる。プレニル残基は、いくつかの膜結合性蛋白において基質蛋白のカルボキシ末端の“CXXX”ボックスに含まれていることが示されている、システインのスルフヒドリル基に付加することが、知られている。特に、そのような膜結合性蛋白の一つは、ラス（ras）ーガン遺伝子の蛋白生成物であることが示されている。膜蛋白の疎水性に関するこれらの反応の概要は、プレ

ニル化を含めて、M. Hoffman、*Science* (1991) 254: 650-651 及び J. B. Gibbs、*Cell* (1991) 65: 1-4 によって明かにされた。

更に、プレニル化は、プレニル化蛋白のカルボキシ末端を変異させる一連の追加反応の第一段階であることが多い。これらのプレニル化起動又はポストプレニル化の反応には、カルボキシメチル化とタンパク質加水分解を含む。

今日までのプレニル化基質蛋白における研究では、CXXXボックスは、2、3位に脂肪族残基を、そして末端位にロイシン、セリン、メチオニン、システイン又はアラニンを含んでいる。このように、これまで研究されたCXXXボックスは、ボックス自身が比較的疎水性である。

ウイルス蛋白のプレニル化は、肝炎デルタウイルス（HDV）の形態形成に必要であることが現在分かっている。これは、ウイルス蛋白がプレニル化されるこ

とを最初に示したものである。更には、いくつかの機能上の結果はプレニル化によるものとする事が出来る。プレニル化の標的であるウイルス蛋白は、驚いたことには配列Cys-Arg-Pro-Glnの親水性CXXXボックスを含んでいる。他のヴィリオン (virions) の蛋白のC-端の近傍にある、この比較的親水性のCXXXボックス及び対応するCXXXボックス (親水性或は親油性) 又

は他のシステイン含有配列のプレニル化又はプレニル化起動変異は、抗ウイルス作戦の格好の標的である。

これらの標的としては、現在、A型肝炎 (HAV) ウイルス、C型肝炎 (HCV) ウイルス、ヘルペスシンプレックスウイルス (HSV)、サイトメガロウイルス (CMV)、バリセラーズスターウイルス (VZV)、インフルエンザウイルス、タバコモザイクサテライトウイルス (TMSV) とオオムギストライプモザイクウイルス (BSMV) などの植物ウイルス、B型肝炎ウイルス (HBV) の核抗原及びヒト免疫不全ウイルス-1 (HIV-1) のネフ (nef) 遺伝子生成物などの蛋白などがあると見なす事が出来る。特に、ネフ (nef) がエイズの発現に重要な役割を演ずることが示されて以来、が、しかしこれらに限定されるものではない (H. W. Kesstler III等、Cell (1991) 65: 651-662)。従って、これらの標的蛋白のプレニル化或はそれらのポストプレニル化反応を阻害することは、これらの感染の進行にとって抑止であると言える。

[発明の開示]

本発明は、インビトロ及びインビボ両方において、ウイルスの形態形成、生成、放出或は脱外被を妨げる方法を提供する。少なくとも1つのウイルス蛋白のプレニル化或はポストプレニル化反応を妨げる薬剤を感染細胞に与えて、ウイルス感染を停止させる。そのよ

うな細胞は培養基に含まれてもよいし、動物或は植物の被検体中に含まれていてもよい。

このように、一つの視点において、本発明は、ウイルスの形態形成、生成、放出或は脱外被を抑止する方法に関するもので、その方法は、少なくとも1つのウ

ウイルス蛋白のプレニル化或はポストプレニル化反応を効果的に妨げることから成る。他の視点において、本発明は、候補薬剤をプレニル化阻害能力で選別する検定法に関する。第三の視点において、本発明は、ウイルス蛋白のプレニル化或はポストプレニル化反応を阻害するのに効果のある薬剤を投与することにより、ウイルス感染を治療する方法に関する。好ましい実施態様においては、ウイルス蛋白は、D型肝炎ウイルスの大 (large) デルタ抗原、HBVの核抗原或はHIVのネフ (nef) 蛋白である。

[図面の簡単な説明]

図 1 A と 1 B は、ウイルス蛋白を表すウイルス感染細胞であって、トリチウム化メバロネートで処理されたものの溶菌によって得られた蛋白のイムノプロットの写真である。

図 2 A と 2 B は、野生型又は突然変異ウイルス蛋白を含み、トリチウム化 (tritiated) プロリン又はメバロネートで標識された細胞の溶解物から誘導された蛋白のイムノプロットの写真である。

図 3 A、3 B、3 C 及び 3 D は、ウイルス蛋白を含む種々の細胞上澄み液のイムノプロットの写真である。

図 4 は、HDV形態形成の進行を図示したものである。

[発明の実施の態様]

肝炎デルタウイルス (HDV) 感染は、急性、慢性両方の肝臓疾患を引き起こし、致命的になり得る (1、2)。このRNAウイルスは、1.7 kbの一本鎖環状ゲノムとデルタ抗原—唯一知られているHDV—コード化蛋白—を含む。これらの成分は、B型肝炎ウイルス表面抗原が埋め込まれている脂質外被によって包み込まれており (3)、それはなぜHBV感染が付随して起こる場合のみHDV感染が起こる (4、5) のかを説明している。デルタ抗原の2つのイソ型は、感染した肝臓と血清中に存在する (6、7)。この異質性は、デルタ抗原の末端コドンの一つのヌクレオチドにおける一方向性の突然変異 (コドン196: UAG→UGG) —それは複製の間に生ずる (8) —から起こる。このように、小デルタ抗原は195個のアミノ酸の長さであるが、大デルタ抗原は、そのC00H末端に更に19のアミノ

酸を含む以外は、同等の配列である。両形態のデルタ抗原とも、同一のRNAケノムバインディングドメインを含んでいるが(9)、それらは、ゲノム複製に対して劇的に異なる効果を有する。大きな形態のものが強力なトランス優性の阻害剤 (potent trans-dominant

t inhibitor) であるのに対し(10、11)、複製には小さな形態が必要である。

大デルタ抗原の最後の4つのアミノ酸は、Cys-Arg-Pro-Gln-COOHである。このCOOH末端構造-CXXXボックスと称する(但しCはシステインで、Xは任意のアミノ酸)は、メバロン酸から誘導される、システイン・15炭素部分(ファルネシル)又はシステイン・20炭素部分(ゲラニルケラニル) (cystein 15 or 20 carbon moieties) に付加するプレニル転移酵素の基質として関連付けられている(12-14)。生じた疎水性変異体は、p21ラス(Ras)(15、16)及びラミンB(12、17)に対して提案されているように、誘導された蛋白(derivatized protein)の膜結合性を助けうる。我々によって、大デルタ抗原が同様に変異されていることが、今明示された。

他のヴィリオンも、プレニル化に適した標的配列を含んでいる。これらの配列は、標的のウイルス蛋白のカルボキシ末端の近くにあり、CXXXボックスの形でありうるが、B型肝炎ウイルス(HBV)の核抗原及びHIV-1のネフ(nef)遺伝子生成物のように、システインはC-末端のアミノ酸としての位置を含めて、C-末端のより近い位置(closer)でもありうる。

大デルタ抗原がプレニル化のための基質であるかどうかを決定するために、3つの細胞系統、SAG、LAG、

GP4Fを[³H]メバロン酸で標識した。GP4F細胞はNIH3T3細胞の誘導体である(18)。SAG(19)とLAG(20)細胞は、それぞれ小及び大デルタ抗原を安定的に発現する、GP4F細胞の誘導体である。

標識細胞溶解物をイムノブロット法(図1A)で分析して、小及び大デルタ抗原の定常状態量を検出した。溶解物は、デルタ抗原に対する抗体(抗-デルタ)

、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) 及び蛍光光度法 (図1 B) を使って、免疫沈降も行った。

更に詳しくは、図1を参照すると、大デルタ抗原が培養された細胞中でプレニル化されているのが示されている。細胞系統、SAG (19) (レーン1)、LAG (20) (レーン2) 及びGP4F (18) (レーン3) をロバスタチン ($25 \mu\text{M}$) 及び (R, S) - [5- ^3H] メバロネート (140 mM) 中で一晩培養し (30)、RIPA緩衝液 [50mM トリス (pH7.5)、150mM NaCl、1%NP-40、0.5%デオキシコール酸ナトリウム、0.1%SDS] に細胞溶解した (20)。(A) アリコートでイムノブロット分析にかけた (11)。ブロットを、デルタ抗原に対する抗体 ($\alpha - \delta \text{ Ag}$) を含むHDV感染患者からとった血清とヒト免疫グロブリンG (IgG) (Promega) に対するセイヨウワサビパーオキシダーゼ共役ウサギ抗体で処理し、続いて化学ルミネセンス (アメルシャム) 顕色

(B) を行った。細胞抽出液から得た (B) 免疫沈降物 ($\alpha - \delta \text{ Ag}$ による) について、SDS-PAGEと蛍光光度法を行った。図1においてSは小デルタ抗原を、Lは大デルタ抗原を示す。分子サイズマーカーが左に (キログルトンで) 示されている。

このように、小ではなく大抗原が [^3H] メバロン酸で標識されたことは大デルタ抗原が培養細胞中でプレニル化を受けることを示唆するものである。

[^3H] プロリン又は [^3H] メバロネートの存在下で行ったインビトロの翻訳反応を用いた場合にも、同様の結果が得られた (図2)。図2には、大デルタ抗原のCys²¹¹のSerへの突然変異及びプレニル化の欠損が示されている。インビトロ翻訳反応を、(A) L- [2, 3, 4, 5- ^3H] プロリン ($19 \mu\text{M}$) (94 Ci/mmol 、アメルシャム) か又は (B)、 [^3H] メバロネート ($200 \mu\text{M}$) (30) の存在下で、ウサギ網状赤血球溶解物 (Promega) を使って行った。(A) と (B) については、翻訳反応には小デルタ抗原mRNA (レーン1) ; 大デルタ抗原mRNA (レーン2) ; 水 (レーン3) ; 又は大デルタ抗原 (Cys²¹¹→Ser) (20) mRNA (レーン4) を用いた。各反応物の一部 ($20 \mu\text{l}$) を1mlのRIPA緩衝液に添加し、 $\alpha - \delta \text{ Ag}$ で免疫沈降させ、上記のように分析した (図1)。

大イソ型のみが [^3H] メバロネートで標識されたの

に対し (図2B)、小及び大抗原両方が [^3H] プロリンで標識された (図2A)。

[^3H] メバロネートによる変異が、Cys²¹¹が末端のCXXXボックスに存在することに依存しているかどうかを決定するために、この位置にセリンを含む突然変異体を作った (20)。Cys²¹¹は大デルタ抗原における唯一のシステインである。Cys²¹¹をSerに突然変異させることは、大デルタ抗原の合成の妨げにはならなかったが (図2A)、 [^3H] メバロネートによるその変異は生じなかった (図2B)。

大デルタ抗原のメバロネート変異の特異型は、ファルネシルよりむしろゲラニルケラニルであるように見える (21)。最初に述べたCXXXボックスは、Cysの後の1番目及び2番目に脂肪族残基を含んでいたが、他の型のアミノ酸についてはプレニル化部位に見い出すことが出来る (13、14)。COOH末端配列Cys-Arg-Pro-Gln-COOH—前述のCXXXボックスとは違—but、新規のプレニル化酵素の存在を意味するものであるかどうか、或は又それが、既知のプレニル化転移酵素のより広い基質特異性を反映するものなのかどうかは明確でない。

HDV粒子形成については、デルタ抗原及び関連するゲノムは、恐らくはHBVエンベロープ蛋白を含んでいる細胞膜を標的としている。大デルタ抗原のプレニル化がこの工程に含まれ得ると仮定し、大デルタ抗原が

HDV様粒子形成に充分かどうか最初に調べた。HBV表面抗原 (HBsAg) が、小又は大デルタ抗原と共にCOS-7細胞に短時間現れた。HBsAg-含有外被に包み込まれたデルタ抗原からなるウイルス様粒子を、HBsAgに対する抗体 (抗HBs) を使い、澄清化媒質 (clarified media) 上澄み液の免疫沈降法により分析した。

図3には、大デルタ抗原とHBsAg部分を用いた粒子形成が示されている。パネル (A) 及び (B) については、COS-7細胞は、下記プラスミドで短時間トランスフェクトされた：HBV表面抗原を発現するSV24H (31) 及び小デルタ抗原を発現するSVLAg (19) (レーン1)；大デルタ抗原を発現するSV24HとSVL—大 (large) (20) (レーン2)；及びDNA抜きの燐酸カルシウム沈澱物 (レーン3)。(C) と (D) においては、COS-7細胞は、SV24HとSVL—大 (large) (レーン4

); SV24HとSVL-大 (large) (Ser²¹¹) (20) (レーン5); 及びDNA抜きの
磷酸カルシウム沈澱物 (レーン6) でトランスフェクトされた。(A) と (C) に
ついては、トランスフェクション48時間後に、HBsAg含有粒子を抗HBsを使って
清澄化媒質上澄み液の2-mlアリコートから免疫沈降させ (31)、上記のように
イムノブロット (α - δ Agにより) 及び化学ルミネセンス分析を行った (図1)
。(B) と (D) については、トランスフェクトされた細胞を、プロテアーゼ阻害
剤を含む細胞溶

解緩衝液 [50mMトリス (pH8: 8)、2%SDS] に収集し (20)、アリコートで蛋白
イムノブロットと化学ルミネセンス分析を行った。分子サイズマーカーが左に (kDで) 示されている。

免疫沈降物中に存在するデルタ抗原を、イムノブロット分析法で検定した (図3A)。小及び大デルタ抗原共、トランスフェクトされた細胞中で合成されたが (図3B)、大イソ型のみを分泌HBsAg含有粒子内に内包した (図3A)。同様の選択的な内包が観察されている。(22)。

次に、この粒子形成におけるメバロネート変異の機能について調べた。大デルタ抗原の好ましい内包に対する一つの説明は、小抗原はCXXXボックスを欠いており、従って変異を受けることが出来ないというものである。大デルタ抗原のCys²¹¹→Ser突然変異体は、小デルタ抗原の様に振舞い、内包 (package) もされないと考えられる。実際、これはその通りであることが分かった。野生型及びSer²¹¹突然変異体大抗原とも、トランスフェクトされた細胞中で合成されたのに対し (図3D)、野生型のみは粒子内に内包された (図3C)。かくて、大デルタ抗原の突然変異形はプレニル化されず、HBsAgと粒子を形成することができない。

我々の結果によれば、大デルタ抗原のプレニル化は、デルタ抗原とHBV表面抗原を含有する粒子の形成と放

出に必要であることが示唆されている。生産的 (productive) ウイルス感染にプレニル化部位が必要だということは、CXXXボックスの他の突然変異によって (23)、又すべてのHDV単離物配列 (sequenced HDV isolates) の中のCys²¹¹とCXX

Xボックスモチーフの保存によって(24)、更に示唆されている。

小ではなく大デルタ抗原のプレニル化及びウイルス粒子内への内包能力により、小デルタ抗原の終止コドンにおける突然変異誘導異質性の意義が、更に強調される。HDV複製の間に、Sゲノム(小抗原をコード化)が突然変異して、Lゲノム(大抗原をコード化)になる。この突然変異による少なく共2つの効果を識別することが出来る(図4参照)。図4には、SゲノムからLゲノムへの制御転換(regulatory switch)が示されている。複製の間に、小デルタ抗原をコード化するSゲノムが突然変異して、大デルタ抗原をコード化するLゲノムになる。この一つの塩基の突然変異は、デルタ抗原のC00H末端に2つの効果を及ぼす。第1の効果は、C00H末端アミノ酸の性質を変えることであり、即ち、Pro(P)-ゲノム複製を高める(20)-がGln(Q)に置き換わり、その結果ゲノム複製を抑止する。第2の効果は、標的プレニル化部位(CRPQ)が作られることである(ここにCはシステイン; Rはアルギニン; Pはプロリン; Qはグルタミンである)。

このように、第1の効果は、ゲノム複製(小デルタ抗原)のエンハンサーを、強力なトランス優性抑止剤(大デルタ抗原)に転換せしめることである(10、11)。機能に置けるこの劇的な差は、エンハンサー活性を付与するのに充分であるプロリンとC00H末端のアミノ酸の性質によってもっぱら決るように見える(11、25)。第2の効果は、CXXXボックスをデルタ抗原に付加することであり、それは蛋白をプレニル化し、恐らくはそれがHBsAg含有粒子に内包されるのを促進する。小抗原の生成から大デルタ抗原への転換の併合効果は、2つの役割を持っているように見える: 即ち、ゲノムが更に複製されるのを抑制すること、及び内包とヴィリオン形態形成の立上りを促進することである。

我々の結果によれば、プレニル化蛋白を使った抗HDV療法及び他のウイルスに関する抗ウイルス療法のための新しい標的として、プレニル化が示唆されている。そのような療法は、ヴィリオンの形態形成、生成、放出及び脱外被(機能的には、ヴィリオン形態形成の逆反応)を抑止することを目指している。プレニル化の基質として機能することが求められる4つのC-末端側アミノ酸の同義性(degeneracy)が、ますます明らかになることを考慮して、これらのC-末端位のいずれ

かにあるシステインにより、抗プレニル化療法の潜在標

的が見極められると考えられる。

プレニル化経路で作用する酵素を阻害する薬剤とCXXXボックス類似物を含めて、HDVライフサイクルのプレニル化段階を阻止するようないくつかの構想が考えられる。両療法とも、ラス（ras）媒介発ガン性形質転換を抑止するために考えられてきた（26）。p21 Ha-RasのCXXXボックスに相当するテトラペプチド類は、インビトロにおけるp21 Ha-Rasのプレニル化を阻害する（27）。結局、HDVライフサイクルにおける大デルタ抗原の2元機能は、活発に複製するSゲノムで感染した細胞を対象とした、提案された（11）欠陥干渉粒子-（DIP）（28）様療法（defective interfering particle-like therapy）を更に精緻化することを示唆している。Lゲノムは小デルタ抗原の発現源（source）を複製のために必要とするが（19、20）、一旦複製するとそれ以上の複製に対する強力なトランス優性抑止剤を作り出すので、療法上投与されたLゲノムDIPが固有の遮断機構を有しうることは勿論のこと（11）、感染細胞に対して特異的であり得る。もし、LゲノムもまたCys²¹¹からSerへの突然変異を含んでいるのであれば、複製を抑止するのみならず内包に影響を及ぼすデルタ抗原をコード化し得るだろう。

従って、抗ウイルス療法とウイルス形態形成の抑止

に至る新しいアプローチは、少なくとも1つのウイルス蛋白のプレニル化又はポストプレニル化反応の阻害に焦点が絞られる。これは、標的ウイルスに感染した細胞を、少なくとも1つのウイルス蛋白のプレニル化又はポストプレニル化反応を阻害する薬剤の効果量と接触させることにより行いうる。そのような薬剤としては、メバロネート合成経路の誘導体である、プレニル化合物（prenyl groups）の形成阻害剤がある。その他の薬剤としては、小ペプチド、テトラペプチド及びプレニル化されるシステイン残基の状況に似たその他の化合物を含めて、プレニル化の標的配列の近似物ないし誘因物（おとり decoys）がある。例えば、Y. Reise等、*Cell* (1990) 62: 81-88は、C-A-A-Xテトラペプチドによるプレニル

化阻害を報告している。上記のように、プレニル化されるシステイン残基は一般に、標的蛋白のカルボキシ末端にある；最も普通の標的配列はCXXXボックスを含むが、C-末端に比較的近接する（closer）システインも標的となりうる；ゆえに、関連ペプチドとしては、XCXX、XXCX及びXXXCの形のものがある。他の薬剤としては、プレニル化合物自身の誘導体及び類似物がある。その他の適当な薬剤としては、プレニルトランスフェラーゼ酵素及びポストプレニル化反応を触媒する酵素の阻害剤がある。

候補阻害剤の検定

本発明はまた、あるプレニル化蛋白を分泌させるための、プレニル化の必要条件を利用することにより、プレニル化阻害剤としての候補薬剤を選別する方法を提供する。分泌のためにプレニル化が必要なそれらの蛋白に対して、直接かつ単純な方法で検定を実施することが出来る。その分泌がプレニル化に依存している第1の蛋白を分泌するか或は分泌するように変異させた細胞を、実験用細胞として用いる。分泌がプレニル化に依存しない第2の蛋白を、コントロールとして用いる。このコントロール蛋白は、第1蛋白と同一又は異なる宿主細胞により分泌させてもよい。候補薬剤を、両方の蛋白を分泌する細胞か、又は各々を分泌する細胞を組合せたセット（matched sets）に投与する。分泌は、第1及び第2の分泌蛋白の有無について細胞上澄み液を検定することにより、例えば通常のELISA検定法により容易に評価することが出来る。合格する候補薬剤は、コントロール蛋白の分泌を抑止することはないが、分泌のためにはプレニル化が必要なテスト試料では蛋白分泌を抑止する。

HDVの大デルタ抗原は、プレニル化が分泌の必要条件であるウイルス蛋白である。ゆえに、この蛋白は、検定のための有用な試験システムの中心部分を成すものである。プレニル化が必要でない蛋白を分泌するように変異させた細胞を、コントロールとして用いるこ

とが出来る。大デルタ抗原を試験用蛋白として用いる場合、同じ細胞でHBsAgをコントロール蛋白として用いるのが有利である。何故なら、HBsAgもデルタ抗原

の分泌に必要なからである。

勿論、上記の検定法では、阻害剤が、大デルタ抗原或は検定で用いられる他のプレニル化制御分泌蛋白のプレニル化機構を阻止することが必要である。一連のプレニルトランスフェラーゼとプレニル化化合物 (Prenyl groups) が、プレニル化阻害剤が必要か又は求められる種々の蛋白に適用されることが知られている。これらの蛋白は、プレニル化されようとしてでなかつと、分泌されないものもある；そのような1つの例は、ラス (ras) - ガン遺伝子の蛋白生成物である。

それにもかかわらず、上記検定方式を取り入れることにより、分泌蛋白の相当するCXXXボックスの代りに、非分泌蛋白の特徴を示すCXXXボックスを配することによって、これらの非分泌蛋白におけるプレニル化の阻害剤を選別することが出来る。生成するキメラ蛋白は、非分泌蛋白の特徴を示す移入 "CXXX" ボックスのプレニル化特性を示すだろうが、上澄み液に移行して検定にかかる宿主分泌蛋白の能力は保持するだろう。このように、検定を使用してプレニル化阻害剤を検索する標的蛋白の範囲を、非分泌蛋白にまで広げることが出

来る。

プレニル化に依存しない分泌蛋白を与えるコントロールシステムの存在は不可欠である。このコントロールにより、細胞にとって単に毒でしかないか或は分泌一般を抑止する候補阻害剤が、取り除かれる。上記検定の変形の1つにより確認されたプレニル化阻害剤は、ウイルスの抑制だけではなく、一ガンに限らずプレニル化蛋白が関係するのが分かっている他のプロセス或は病状にも使用されることが期待される。

ウイルス蛋白のプレニル化は、蛋白質加水分解やカルボキシメチル化のような、蛋白のそれ以上のポストプレニル化反応にとっては明かに必要条件である。各ステップの本質的連鎖を、問題のウイルス蛋白に最も好都合な点で阻止することが出来る。

阻害剤の投与

アミノ酸配列データベースを調べて、C-末端に "CXXX" ボックスを含むウイル

ス蛋白を選別することによって、プレニル化を行うウイルス蛋白を更に得ることが出来る。そのような蛋白の実例リストとしては、例えば、前記のごとく、HAV、HCV、HSV、CMV、VZV、インフルエンザウイルス、タバコモザイクサテライトウイルス及びオオムギストライプモザイクウイルスなどの植物ウイルス、B型肝炎ウイルスの核抗原及びHIVのネフ（nef）遺伝子生成物などの特異蛋白がある。

適当なプレニル化標的のこれらの候補は、標識メバロン酸を適当なウイルス又はウイルス遺伝子生成物に感染するか又はそれを含んでいる細胞に与え、基準として標識付けをして得られたウイルス蛋白のプレニル化状態を評価することにより、上記類似の方法で有効と確認することが出来る。更に、各ヴィリオンの形態形成におけるプレニル化の役割及び抗ウイルス療法の標的としての妥当性もまた、上記類似の方法で有効と確認することが出来る。

ウイルス形態形成、生成、放出または脱外被を培養中に抑止する場合には、適当な宿主細胞を使ってウイルスを培養し、プレニル化又はポストプレニル化反応を阻害するのに使われる薬剤を培養基中に添加する。感染細胞が、哺乳類被検体或は特にヒト又はその他の霊長類被検体などの動物被検体に含まれる場合、プレニル化阻害に使われる薬剤は、一般に薬物製剤として投与される。選ばれた薬剤の性質に依存する適当な製剤については Reminton's Pharmaceutical Sciences、最新版、Mack Publishing Co.、Easton、PAを見ればよい。投与経路としては、注射投与、経口投与、及び粘膜経由と皮膚経由投与を含めて、標準経路がある。製剤の形態は、選ばれる薬剤の外に投与経路によって選ばれる。薬剤の適当な混合物も活性成分として用いることが出来る。植物に投与する場合、活性成分を植

物細胞に導入できる製剤を担体として用いる。

下記の参考文献を、明細書本文中の参照番号に従って列挙する。

参考文献及び注解

1. M. リツエット (Rizzetto)、Hepatology (1983) 3:729.

2. J. H. ホフネーグル (Hoffnagle) 、J. Am. Med. Assoc. (1989) 261:13
- 21.
3. F. ボニノ (Bonino) 等、Infect. Immun. (1984) 43:1000.
 4. M. リツェット (Rizzetto) 等、J. Infect. Dis. (1980) 141:590.
 5. M. リツェット (Rizzetto) 等、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. (1980) 77:6124.
 6. K. F. バーグマン (Bergmann) 等、J. Infect. Dis. (1986) 154:702.
 7. F. ボニノ (Bonino) 等、J. Virol (1986) 58:945.
 8. G. ルオ (Luo) 等、同上 (1990) 64:1021.
 9. J. H. リン (Lin) 等、同上、p. 4051.
 10. M. チャオ (Chao) 等、同上、p. 5066.
 11. J. S. グレン (Glenn) 等、同上 (1991) 65:2357.
 12. J. A. グロムセット (Glomset) 等、Trends Biochem. Sci. (1990) 15:13
- 9.
13. W. A. マルテーズ (Maltese) 、FASEB J. (1990) 4:3319.
 14. S. L. ムーレス (Moores) 等、J. Bio. Chem. (1991)
- 266:14603.
15. J. F. ハンコック (Hancock) 等、Cell (1989) 57:1167.
 16. W. R. シェーファー (Schafer) 等、Science (1989) 245:379.
 17. L. A. ベック (Beck) 等、J. Cell Biol. (1988) 107:1307.
 18. H. エレンス (Ellens) 等、Methods Cell Biol. (1989) 31:155.
 19. J. S. グレン (Glenn) 等、J. Virol. (1990) 64:3104. SAG細胞はGAG細胞と同等。
 20. J. S. グレン (Glenn) 、学位論文、カリフォルニア大学、サンフランシスコ (1992) .
 21. J. S. グレン (Glenn) 等、未発表データ.
 22. J. C. ワン (Wang) 等、J. Virol. (1991) 65:6630 ; W. -S. リュウ (Ryu) 等、同上 (印刷中) ; C. スーロー (Sureau) 、個人情報.

23. W. -S. リュウ (Ryu) 等、準備中.

24. 14の独立ウイルス単離集団(配列)の内、大デルタ抗原の4つの末端アミノ酸として、Cys-Arg-Pro-Gln-COOHをコードする配列が13、Cys-Thr-Pro-Gln-COOHをコードする配列が1 [K. S. ワン (Wang) 等、Nature (1986) 323:508; S. 牧野等、同上 (1987) 329:343;

M. Y. P. クオ (Kuo) 等、J. Virol. (1988) 62:1855; J. A. サルダンハ (Saldanha) 等、J. Gen. Virol. (1990) 71:1603; Y. P. キシア (Xia) 等、(1990) 178:331; F. 今関等、J. Virol. (1990) 64:5594; Y. -C. チャオ (Chao) 等、Hepatology (1991) 13:345; P. デニー (Deny) 等、J. Gen. Virol. (1991) 72:735] .

25. 大デルタ抗原のCOOH末端GlnのProへの特異的突然変異は、蛋白質を抑止剤からゲノム複製のエンハンサーへ転換させたことを、我々は最近発見した。

26. J. B. ギブス (Gibbs) 、Cell (1991) 65:1.

27. Y. レイス (Reiss) 等、同上 (1990) 62:81.

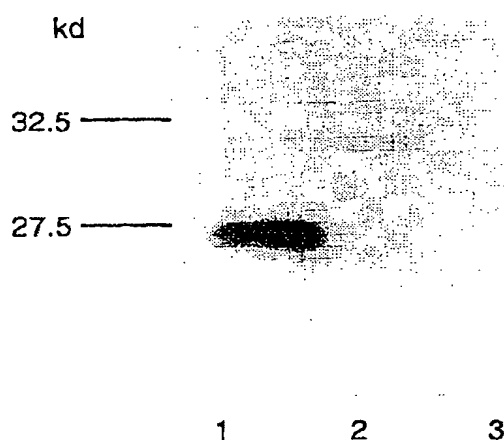
28. R. F. レーミツヒ (Ramig) 、Virology、B. N. フィールズ (Fields) 等編 (レーベン (Raven) 、ニューヨーク、1990) 、pp. 112-122.

29. M. Y. P. クオ (Kuo) 等、J. Virol. (1989) 63:1945.

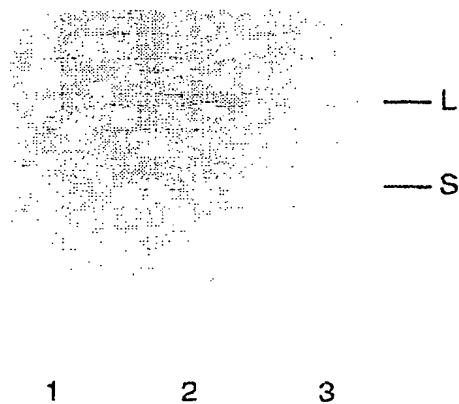
30. R. K. ケラー (Keller) 、J. Biol. Chem. (1986) 261:12053の方法に従って、(R, S) - [5-³H] メバロネート (4-18.8 Ci/mmol) が合成された。

31. V. ブルース (Bruce) 等、J. Virol. (1991) 65:3813.

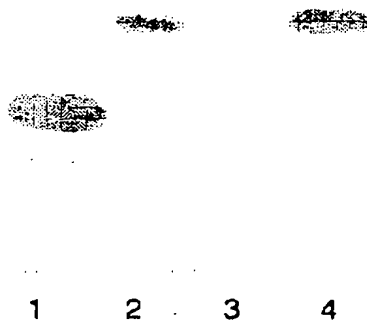
【図1A】

**FIG._1A**

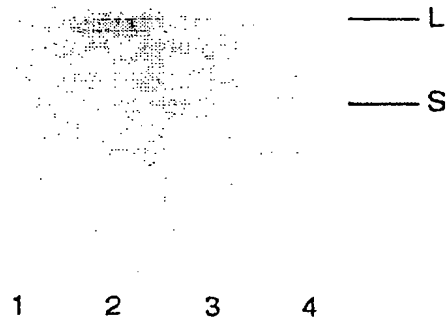
【図1B】

**FIG._1B**

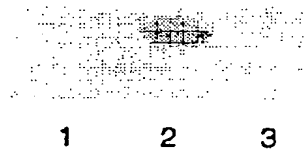
【図2A】

**FIG._2A**

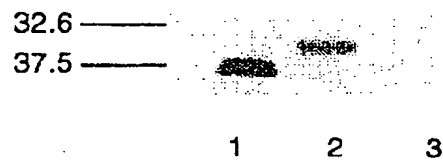
【図2B】

**FIG._2B**

【図3A】

**FIG._3A**

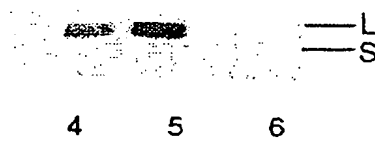
【図3B】

**FIG._3B**

【図3C】

**FIG._3C**

【図3D】

**FIG._3D**

【図4】

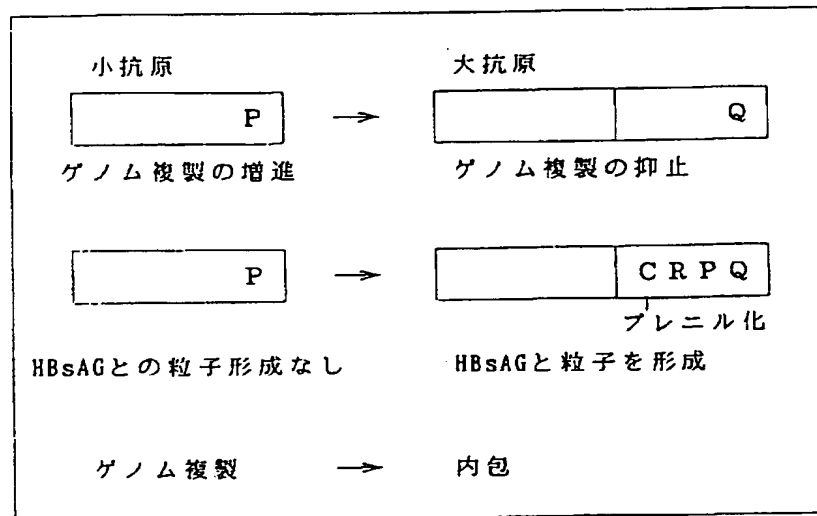


Fig. 4

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US93/05247

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(S) : C12Q 1/70; C12N 7/04, 7/06; A61K 35/76

US CL : 424/93A, 93T; 435/5, 236, 238

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

U.S. : 424/93R, 93A, 93T; 435/4, 5, 6, 7.2, 7.4, 172.3, 235.1, 236, 238, 963; 436/86, 87

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

Please See Extra Sheet.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Cell, Volume 62, issued 13 July 1990, Y. Reiss <u>et al.</u> , "Inhibition of Purified p21ras farnesyl:protein transferase by cys-AAX peptides", pages 81-88.	1-4, 6, 8, 9-12
T	Gastroenterology, Volume 103, issued 1992, T. Koff, "Prenylation of the large hepatitis virus antigen: a target for antiviral therapy", pages 1989-1970.	1-3, 6-7, 9
X	Journal of General Microbiology, Volume 92, issued 1975, R.E. Detroy <u>et al.</u> , "Patulin Inhibition of Mycovirus Replication in <u>Penicillium stoloniferum</u> ", pages 167-174, see entire document.	1-3
L	FEBS Letters, Volume 318, No. 1, issued February 1993, S. Miura <u>et al.</u> , "Inhibition of protein prenylation by patulin". pages 88-90. document establishes a mode of action for patulin.	1-3

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	* "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
* "A" document defining the general state of the art which is not considered to be part of particular relevance	* "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
* "E" earlier document published on or after the international filing date	* "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
* "L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	* "Δ" document member of the same patent family
* "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
* "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search

23 July 1993

Date of mailing of the international search report

05 AUG 1993

 Name and mailing address of the ISA/US
 Commissioner of Patents and Trademarks
 Box PCT
 Washington, D.C. 20231

Facsimile No. NOT APPLICABLE

Authorized officer

GABRIELE E. BUGAISKY

Telephone No. (703) 308-0196

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US93/05247

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Nature, Volume 204, issued 26 December 1964, W.A. Richtsel <u>et al.</u> , "Antiviral Activity of Gliotoxin and Gliotoxin Acetate", pages 1333-1334, see entire document.	1-3,9
L	J. Antibiotics, Volume 45, No.11, issued November 1992, D. Van der Pyl <u>et al.</u> , "Inhibition of farnesyl-protein transferase by gliotoxin and acetylgliotoxin", pages 1802-1805, establishes a mode of action for gliotoxin.	1-3, 9
X,P Y	J. Biol. Chemistry, Volume 267, No 31, issued 05 November 1992, J. H. Overmeyer <u>et al.</u> , "Isoprenoid requirement for intracellular transport and processing of murine leukemia virus envelope protein", pages 22686-22692, see entire document.	1-3 8
X,P Y	Science, Volume 256, issued 29 May 1992, J.S. Glenn <u>et al.</u> , "Identification of a prenylation Site in Delta Virus Large Antigen", pages 1331-1333, see entire document.	1-3, 5-7 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US93/05247

B. FIELDS SEARCHED

Electronic data bases consulted (Name of data base and where practicable terms used):

APS, Dialog files 5, 155,357 (Biosis, Medline, Biotechnology Abstracts)

Search Terms: Protein?, antigen?, prenyl?, virus?, virion?, viral, inhibit? morphogenesis, maturation, lovastatin, mevacor, mevalonic acid, clinic?, hydroxymethylglutaryl coA reductase (4n) inhibitor, (prenyl? or farnesyl? or geranyl?)(5n)transferase?, inhibit?, hydroxymethylglutaryl coA reductase, lipid?, sterol?, mevalon?, antibiotic? ascochlorin, isopren?, patulin, antiviral agents, cholesterol, gliotoxin

フロントページの続き

(81) 指定国 EP(AT, BE, CH, DE,
DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M
C, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG
, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN,
TD, TG), AT, AU, BB, BG, BR, CA,
CH, CZ, DE, DK, ES, FI, GB, HU, J
P, KP, KR, KZ, LK, LU, MG, MN, MW
, NL, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD,
SE, SK, UA, US, VN

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.